

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
2 mai 2002 (02.05.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/34789 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C07K 16/08, A61K 39/42, C12N 5/20,
G01N 33/53, C12Q 1/70, A61P 31/20

F-69002 Lyon (FR). **BECQUART, Laurence** [FR/FR]; 6,
rue Paul Painlevé, F-69800 Saint Priest (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/03169

(74) Mandataires : **GROSSET-FOURNIER, Chantal** etc.;
Grosset-Fournier & Demachy SARL, 20, rue la Maubeuge,
F-75009 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international :
12 octobre 2001 (12.10.2001)

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/13454 20 octobre 2000 (20.10.2000) FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) :
BIOMERIEUX SA [FR/FR]; 376, chemin de l'Orme,
F-69280 Marcy-l'Etoile (FR).

(71) Déposant (*pour US seulement*) : **JOLIVET-REYNAUD,**
Colette [FR/FR]; Les Cèdres, 29, route Nationale, F-69720
Saint Bonnet de Mure (FR).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) :
LESENECHAL, Mylène [FR/FR]; 84, rue Ana-
tole-France, F-69100 Villeurbanne (FR). **BAT-**
TAIL-POIROT, Nicole [FR/FR]; 6, quai Jules Courmont,

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: MONOCLONAL ANTIBODIES DIRECTED AGAINST HEPATITIS B VIRUSES

(54) Titre : ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGES CONTRE DES VIRUS DE L'HEPATITE B

(57) Abstract: The invention concerns a monoclonal antibody capable of binding with a wild type HBsAg antigen and with at least one, preferably at least two and advantageously more than two, mutated forms of the HBsAg antigen, said monoclonal antibody binding with the peptide sequence consisting of at least 6 adjacent amino acids in the 199-208 region of the HBsAg antigen, and advantageously binding with the peptide sequence formed by the 199-208 region of the HBsAg antigen.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet un anticorps monoclonal capable de se lier à un antigène HbsAg de type sauvage et à au moins une, de préférence au moins deux et avantageusement plus de deux, formes mutantes de l'antigène HbsAg, ledit anticorps monoclonal se liant à une séquence peptidique consistant en au moins 6 acides aminés contigus dans la région 199-208 de l'antigène HbsAg, et avantageusement se liant à la séquence peptidique constituée par la région 199-208 de l'antigène HbsAg.

WO 02/34789 A1

ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGES CONTRE DES VIRUS DE L'HEPATITE B

Cinq types d'hépatites virales, les hépatites A, B, C, D, E, sont assez bien
5 connues à ce jour. Dans chaque cas, le virus envahit le foie et provoque un état inflammatoire
avec une destruction des cellules hépatiques.

L'hépatite B est causée par un virus, le virus de l'hépatite B humain (HBV). Le
virus HBV a été découvert par Blumberg et al. A « new » antigen in leukemia sera, JAMA
191 : 541, (1965). Le virus est transmis par voie sanguine, par contact sexuel ou par voie
10 périnatale.

L'infection par HBV dans la majorité des cas n'entraîne aucun symptôme et est
responsable d'hépatites aiguës asymptomatiques. L'hépatite aiguë se caractérise par des
troubles digestifs, des douleurs abdominales, une coloration des urines et une décoloration des
féces anormales, une asthénie et un ictère. L'hépatite aiguë peut évoluer vers une forme
15 fulminante avec une nécrose rapide du foie.

L'infection virale peut également évoluer vers une forme chronique, soit chez
des patients ayant présenté une hépatite aiguë, soit chez des individus pour lesquels l'infection
était asymptomatique. Les porteurs chroniques présentent des lésions hépatiques d'importance
variable et un risque élevé d'évolution vers une cirrhose et le développement d'un cancer
20 primitif du foie. En Asie et en Afrique où la chronicité des infections est fréquente, les cancers
primitifs du foie représentent un problème crucial de santé publique. Par ailleurs, les porteurs
chroniques représentent des réservoirs pour le virus et permettent sa propagation transposant
le problème de santé publique au niveau mondial.

L'infection par HBV est une des infections virales les plus courantes chez
25 l'homme. C'est une maladie ubiquitaire avec une incidence géographique distincte. En Europe
et en Amérique du Nord entre environ 0,1% et 1% de la population est infectée, alors qu'en
Asie et en Afrique jusqu'à 20% de la population est porteuse de HBV. On estime à environ
350 millions le nombre de personnes infectées par HBV à travers le monde.

Une hiérarchisation des infections virales suite à une transfusion montre que la
30 transmission de HBV est la première, suivie de HCV et ensuite de HIV.

HBV est un petit virus à ADN de 42 nm de diamètre qui appartient au groupe des
virus à ADN hépatotropes (hepadnavirus) et est classé dans la famille des *Hepadnaviridae*. Sa

structure génomique est remarquablement compacte. Le virus comprend une enveloppe externe et une nucléocapside. L'enveloppe est composée principalement de trois antigènes de surface (HBsAgs : hepatitis B surface antigens) qui jouent un rôle majeur dans le diagnostic des infections par HBV. La nucléocapside contient l'antigène du core (HBcAg), une ADN polymérase/transcriptase inverse, ainsi que le génome viral. Le noyau viral constitue l'élément infectieux du virus et la membrane externe porte le principal déterminant antigénique du virus, l'antigène HBs. Le noyau viral demeure à l'intérieur de la nucléocapside. Son diamètre est d'environ 28 nm.

En dépit de sa petite taille (3200 paires de bases) l'ADN circulaire, partiellement double brin, de HBV code pour quatre types de produits viraux à partir de ses gènes chevauchants S, C, P, et X.

Le gène S code pour la protéine d'enveloppe HBsAg exprimée sur la surface externe du virion. La protéine d'enveloppe HBsAg est constituée de deux polypeptides majeurs, un polypeptide de 24 kDa et sa forme glycosylée de 28 kDa. HBsAg contient l'épitope majeur neutralisant de HBV, dénommé déterminant « a », qui correspond aux acides aminés 124 à 147 et est commun à tous les isolats de HBV. Le déterminant « a » est la cible la plus importante pour le diagnostic et la vaccination. Le développement d'anticorps anti-HBs après une infection aiguë ou chronique est généralement associé à un rétablissement et à un pronostic favorable. Les anticorps anti-HBs sont également associés à la production d'anticorps neutralisants après vaccination. La majorité des anticorps anti-HBs trouvés dans le sérum d'individus convalescents ou après vaccination se lient à la région du déterminant « a ». Bien que la structure tridimensionnelle de l'antigène HBs n'ait pas encore définie, des études de structure-fonction indiquent que le déterminant « a » est localisé dans la principale région hydrophile de l'antigène HBsAg (résidus 99 à 169). Il est clair que le déterminant « a » est très structuré parce que la dénaturation de cette zone par alkylation ou réduction donne des particules HBsAg dont l'antigénicité est fortement réduite. Il est probable que des ponts disulfure entre des cystéines sont impliqués dans une conformation correcte. Une structure potentielle du déterminant « a » (résidus 124-147), qui comprend cinq cystéines, impliquerait l'existence de ponts disulfure entre les acides aminés 124 et 137, formant une première boucle, et entre les acides aminés 139 et 147, formant une deuxième boucle. L'intégralité de la séquence du déterminant « a » contribue probablement à la structure antigénique. De plus, l'antigène HBsAg contient soit le déterminant *d* ou *y* qui correspond respectivement à la

présence de soit une lysine ou une arginine à la position 122 et, soit le déterminant *w* ou *r* qui correspond respectivement à la présence soit d'une lysine ou d'une arginine à la position 160. Il y a donc quatre sous types antigéniques majeurs de HBsAg, *adw*, *ayw*, *adr* et *ayr*, chacun étant associé à une distribution géographique. En amont du gène S, les gènes Pré-S codent
5 pour divers antigènes de surface de HBV.

Le gène P code pour l'ADN polymérase/transcriptase inverse, très importante dans le mécanisme de la réplication virale.

Le gène C code pour deux protéines de la nucléocapside, HBeAg qui est une protéine sécrétée soluble et HBcAg, la protéine core intracellulaire. HBeAg est un marqueur
10 sérologique d'une réplication virale élevée.

Le gène X code pour HBxAg qui a différents effets biologiques et qui peut notamment transactiver la transcription de gènes viraux et cellulaires.

Quand HBV infecte un individu, l'ADN viral se réplique totalement à l'intérieur des cellules hépatiques de l'hôte.

15 Après infection par HBV, le premier marqueur détectable dans le sérum de patient est l'antigène HBsAg, mais ce marqueur persiste rarement au delà de six mois. Après que l'antigène HBs ait disparu dans le sérum, les anticorps anti-HBsAg deviennent détectables et persistent. Parce que l'antigène HBc est séquestré par l'antigène d'enveloppe HBs, il n'est pas détectable en routine dans les sérums de patients, mais la présence d'anticorps anti-HBc
20 est facilement mise en évidence dans les une à deux semaines suivant l'apparition de l'antigène HBs.

Il est cependant maintenant certain que les tests sérologiques conventionnels, mettant en œuvre les marqueurs précités, ne permettent pas de détecter les variants de HBV. Or, le fait que des patients porteurs de HBV et ayant développé une hépatite B chronique
25 existent, sans qu'il soit possible de mettre en évidence une infection par HBV à l'aide des marqueurs sérologiques traditionnels, est de la plus haute importance et montre la nécessité de développer de meilleurs tests.

L'existence de variants de HBV est suspectée depuis de nombreuses années. Cette présomption est basée sur la détection d'ADN viral dans le sérum et/ou le foie de
30 patients présentant une hépatite chronique, en l'absence de mise en évidence des marqueurs sérologiques conventionnels (HBsAg et anti-HBc).

L'incapacité à détecter HBsAg chez des patients porteurs de séquences ADN du virus pourrait avoir plusieurs explications, telles qu'une faible expression de l'antigène de surface ou la présence de mutations au niveau du déterminant antigénique de la protéine S. Dans le premier cas, une co-infection virale pourrait supprimer la réplication de HBV (Jilg W et al., J. Hepatol, 1995, 23 : 14-20, Jylberberg et al., Clinical infection diseases, 1996, 23 : 1117-1125, Ushida et al., J. of Med. Virol. 1997, 52 : 399-405, Hofer et al., Eur. J. Clin ; Microbiol. Infect. Dis., 1998, 17 : 6-13. Une autre explication pourrait être que l'antigène HBs est masqué lors de la formation *in vivo* de complexes immuns avec les anticorps anti-HBs.

Mais, plus récemment, la présence d'HBsAg a été observée dans des sérums anti-HBs de patients. La présence de l'antigène HBsAg chez ces patients pourrait être lié au fait qu'il n'a pas été neutralisé par les anti-HBs présents, suggérant la présence de variants.

La présence de variants ou mutants a été associée à la vaccination et à la thérapie utilisant des anticorps polyclonaux ou monoclonaux. L'analyse de mutants semble montrer qu'ils ont été sélectionnés à partir d'une population mélangée et présentent des mutations ponctuelles causant des substitutions en acides aminés dans le déterminant « a ». Les mutants semblent être le produit de mutations au hasard dans le gène qui conduisent à un pool de génotypes. On pense par ailleurs que la réponse immune est le facteur prédominant dans la sélection des mutants. Généralement, l'addition d'anticorps monoclonaux à des cellules infectées par un virus *in vitro* conduit à une sélection d'isolats qui ne sont pas neutralisés par l'anticorps. Il n'est donc pas surprenant que des anticorps monoclonaux donnés à des patients avec une réplication virale active puissent avoir comme résultat une sélection de mutants d'échappement. Plusieurs mutants d'échappement séparés d'importance clinique ont été trouvés chez des individus vaccinés. Dans plusieurs cas, ils présentaient une mutation ponctuelle au niveau du codon qui code pour l'acide aminé 145 dans le déterminant « a » de l'antigène HBsAg, avec comme résultante le changement d'une glycine en arginine. L'administration de sérum contenant un tel mutant à un chimpanzé a montré que ces agents sont transmissibles. Une autre mutation ponctuelle induisant le remplacement d'une lysine par un acide glutamique à la position 141 du déterminant « a » a également été trouvée chez des sujets vaccinés. Il est donc important de pouvoir détecter de manière sûre et fiable, non seulement HBV de type sauvage, mais également les mutants ou variants. En effet, si une mutation significative survient au niveau de l'épitope de HBsAg et qu'elle n'est pas reconnue par les anticorps anti-HBs alors, soit le mutant ne sera pas détecté, soit le test ne sera pas

suffisamment sensible. Or, le fait de ne pas détecter un mutant d'échappement a non seulement une incidence pour la personne qui le porte, mais peut également conduire à la transmission de l'infection par les dons de sang, de produits sanguins et d'organes. Par ailleurs, un mutant HBsAg peut infecter des individus même s'ils ont été antérieurement
5 immunisés et présentent une réponse de type anti-HBs. Il a été décrit, dans la demande de brevet internationale WO 94/26904, un anticorps monoclonal qui permet de discriminer la forme HBsAg sauvage d'un mutant d'échappement qui comprend une mutation à la position 122. Mais, il existe un besoin sérieux de caractériser des anticorps monoclonaux qui soient capables de détecter à la fois le type sauvage et les formes mutantes de l'antigène HBsAg pour
10 le développement de tests de diagnostic fiables (Coleman et al. (1999), Journal of Medical Virology 59 : 19-24 ; Ireland et al. (2000), Hepatology 31 : 1176-1181). En effet, dans certains cas, des formes mutantes de HBV affectant la région du gène d'enveloppe codant pour le déterminant « a » ne sont pas reconnues par les anticorps monoclonaux utilisés dans les tests de diagnostic commerciaux (Carman et al. (1990), Lancet 336 : 325-329 ; Seddigh-
15 Tonekaboni et al. (2000), Journal of Medical Virology 60 : 113-121 ; Weinberger et al. (2000), Journal of General Virology 81 : 1165-1174).

Ainsi la présente invention a pour objet un anticorps monoclonal capable de se lier à un antigène HBsAg de type sauvage et à au moins une, de préférence au moins deux et
20 avantageusement plus de deux, formes mutantes de l'antigène HBsAg, ledit anticorps monoclonal se liant à une séquence peptidique consistant en au moins 6 acides aminés contigus dans la région 199-208 de l'antigène HBsAg, et avantageusement se liant à la séquence peptidique constituée par la région 199-208 de l'antigène HBsAg.

Aussi, la présente invention a pour objet un anticorps monoclonal qui est capable de spécifiquement se lier à un antigène HBsAg de type sauvage et à au moins une, de
25 préférence au moins deux et avantageusement plus de deux, formes mutantes de l'antigène HBsAg, ledit anticorps monoclonal se liant spécifiquement à la région 199-208 de l'antigène HBsAg.

La capacité de l'anticorps monoclonal de la présente invention à se lier spécifiquement à des formes sauvage et mutantes de l'antigène HBsAg est reliée au fait qu'il
30 reconnaît une région de l'antigène de surface très conservée, comme montré pour la première fois par les inventeurs par « mapping » d'épitopes, à la fois chez les formes sauvage et mutantes de HBV qui correspond à la région ou épitope localisé entre les acides aminés 199 et

208 de l'antigène HBsAg, et ceci indépendamment de la présence d'autres mutations ou substitutions en acides aminés qui peuvent survenir au niveau du déterminant « a » ou à proximité du déterminant « a » de l'antigène HBsAg. Ainsi, l'anticorps monoclonal de l'invention est capable de reconnaître et de se lier spécifiquement à au moins une forme mutante de l'antigène HBsAg qui comprend au moins une substitution d'un acide aminé dans le déterminant « a » de l'antigène HBsAg et, en particulier, des formes mutantes de l'antigène HBsAg qui présentent au moins une substitution en acides aminés aux positions 127, 133, 134, 142, 143, 144 et 145 du déterminant « a » de l'antigène HBsAg et éventuellement au moins une autre substitution en acides aminés aux positions 100, 118, 120, 122 de l'antigène HBsAg. Les mutations ou substitutions identifiées sont positionnées par rapport à la séquence en acides aminés de l'antigène HBsAg de type sauvage.

Les formes mutantes qui sont spécifiquement reconnues par les anticorps monoclonaux de l'invention sont identifiées dans les exemples qui suivent. Il s'agit plus précisément des mutants :

- 1043 Sp dans lequel une sérine à la position 143 de l'antigène HBsAg est remplacée par une leucine,

- AP 3.1 dans lequel un acide aspartique à la position 144 de l'antigène HBsAg est remplacée par une alanine,

- Arg 1.2 dans lequel une glycine à la position 145 de l'antigène HBsAg est remplacée par une arginine,

- 1157 Sp dans lequel une proline à la position 127 de l'antigène HBsAg est remplacée par une alanine et une sérine à la position 143 de l'antigène HBsAg est remplacée par une leucine,

- 1056 Sp dans lequel une proline à la position 120 de l'antigène HBsAg est remplacée par une sérine et une sérine à la position 143 de l'antigène HBsAg est remplacée par une leucine, et

- M5 dans lequel une tyrosine à la position 100 de l'antigène HBsAg est remplacée par une sérine, une thréonine à la position 118 de l'antigène HBsAg est remplacée par une valine, une arginine à la position 122 de l'antigène HBsAg est remplacée par une lysine, une méthionine à la position 133 de l'antigène HBsAg est remplacée par une isoleucine, une tyrosine à la position 134 de l'antigène HBsAg est remplacée par une asparagine, une proline à la position 142 de l'antigène HBsAg est remplacée par une sérine,

une sérine à la position 143 de l'antigène HBsAg est remplacée par une leucine, et une glycine à la position 145 de l'antigène HBsAg est remplacée par une lysine.

Les mutants précités peuvent être utilisés pour le criblage d'anticorps monoclonaux. Les anticorps de l'invention peuvent être, par exemple, criblés contre de l'antigène HBsAg de type sauvage et contre un ou plusieurs mutants tels que décrits ci-dessus. En particulier, les anticorps de l'invention peuvent être criblés contre de l'antigène HBsAg de type sauvage et contre un ou plusieurs mutants HBsAg chacun ayant une ou plusieurs substitutions à au moins une des positions 127, 133, 134, 142, 143, 144 et 145 de l'antigène HBsAg, plus particulièrement à au moins une des positions 143, 144 et 145 de l'antigène HBsAg et éventuellement au moins une autre substitution à au moins une des positions 100, 118, 120, 122 de l'antigène HBsAg.

En particulier, les anticorps monoclonaux de l'invention sont capables de se lier à un antigène HBsAg de type sauvage et à au moins un mutant HBsAg portant un déterminant « a » codé par des séquences présentant des mutations ponctuelles au niveau d'un ou plusieurs codons codant pour les acides aminés 127, 133, 134, 142, 143, 144 et 145 de l'antigène HBsAg. Les anticorps préférentiels de l'invention sont les anticorps référencés 2G2G10 et 8B4H7 qui appartiennent à la classe des immunoglobulines G. L'anticorps monoclonal 2G2G10 appartient à la classe des immunoglobulines IgG2b. L'anticorps monoclonal 8B4H7 appartient à la classe des IgG2a et a été obtenu par traitement aux UV de l'anticorps 2G2G10.

La présente invention englobe également les fragments et dérivés des anticorps monoclonaux de l'invention, en particulier les fragments Fab, Fab', F(ab)2 et sFv (Blazar et al., 1997, Journal of Immunology 159 : 5821-5833 et Bird et al., 1988, Science 242 : 423-426), ainsi que les conjugués. Les dérivés des anticorps monoclonaux de l'invention comprennent, entre autres, les anticorps humanisés. Les méthodes pour produire des fragments d'anticorps monoclonaux et des dérivés d'anticorps monoclonaux, incluant les dérivés humanisés, sont bien connues de l'homme du métier. Les formes « humanisées » d'anticorps non humains, par exemple murins, sont des anticorps chimères qui comprennent une séquence minimale dérivée d'une immunoglobuline non humaine. Pour la plupart, les anticorps humanisés sont des immunoglobulines humaines (anticorps récepteur) dans lesquelles des résidus d'une région hypervariable du récepteur sont remplacés par des résidus d'une région hypervariable d'une espèce donneur (anticorps donneur) non humaine, telle que souris, rat, lapin ou primate non humain, ayant la spécificité, l'affinité et la capacité souhaitées. Dans certains cas, les résidus

(FR) de la région Fv de l'immunoglobuline humaine sont remplacés par des résidus correspondants non humains. De plus, les anticorps humanisés peuvent comprendre des résidus qui ne sont pas trouvés dans l'anticorps receveur ou dans l'anticorps donneur. Ces modifications sont effectuées pour améliorer les performances de l'anticorps. En général, l'anticorps humanisé comprendra au moins et de préférence deux domaines variables, dans lesquels tout ou à peu près tout des boucles hypervariables correspondent à une immunoglobuline non humaine et tout ou à peu près tout des régions FR seront celles d'une immunoglobuline humaine. Les anticorps humanisés facultativement pourront aussi comprendre au moins une partie d'une région constante (Fc) d'une immunoglobuline, telle qu'une immunoglobuline humaine (Jones et al., Nature 321 : 522-525 (1986) ; Reichmann et al., Nature 332 : 323-329 (1988) ; et Presta et al., Curr. Op. Struct. Biol. 2 : 593-596 (1992)).

Les anticorps monoclonaux de l'invention et, en particulier les anticorps 2G2G10 et 8B4H7, sont produits par des lignées d'hybridomes selon le protocole décrit dans l'exemple 1 qui suit ou selon un protocole dérivé de celui décrit dans l'exemple 1 et l'invention a aussi pour objet un tel procédé de production des anticorps monoclonaux de l'invention qui consiste à produire une lignée d'hybridome en immunisant un animal mammifère, de préférence murin, avec un antigène HBsAg de type sauvage ou une forme mutante d'un antigène HBsAg, éventuellement sous la forme d'un fragment ou d'un dérivé antigénique approprié, en immortalisant les cellules productrices d'anticorps pour former des hybridomes, en criblant les cultures d'hybridomes contre de l'antigène HBsAg de type sauvage et au moins une forme mutante telle que définie précédemment, éventuellement sous la forme d'un fragment ou dérivé antigénique approprié, et en sélectionnant les hybridomes qui produisent des anticorps qui se lient à l'antigène HBsAg de type sauvage et à au moins une forme mutante telle que définie ci-dessus.

L'invention englobe également un hybridome capable de produire un anticorps monoclonal de l'invention et un procédé pour produire un anticorps monoclonal de l'invention, qui consiste à cultiver un hybridome ou susceptible d'être obtenu selon un procédé tel que défini ci-dessus *in vitro* ou *in vivo* et à récupérer l'anticorps monoclonal à partir du milieu de culture ; ainsi que l'anticorps monoclonal susceptible d'être obtenu par le procédé de culture d'un hybridome.

Les anticorps monoclonaux de l'invention sont utilisables dans un immunoessai pour la détection et/ou quantification de l'antigène HBsAg dans un échantillon présumé le

contenir et donc pour la détection de virus HBV (sauvage et/ou mutants). De tels essais sont applicables au diagnostic clinique et au criblage de produits sanguins. Aussi, la présente invention concerne un procédé de détection et/ou de quantification d'antigène HBsAg dans un échantillon, qui consiste à mettre en contact l'échantillon avec au moins un anticorps monoclonal de l'invention, ou un fragment ou dérivé d'un tel anticorps monoclonal et à mettre en évidence la présence d'au moins un complexe antigène/anticorps, fragment ou dérivé.

Dans un mode de réalisation du procédé de l'invention, l'échantillon est mis en contact avec un anticorps monoclonal de l'invention, ou un fragment ou dérivé de celui-ci et avec au moins un autre anticorps choisi parmi les anticorps polyclonaux ou monoclonaux anti-HBsAg dirigés contre une région ou épitope différent de celui reconnu par les anticorps monoclonaux, fragments ou dérivés de l'invention.

De tels procédés sont réalisés selon la technique dite sandwich ou de compétition bien connues de l'homme du métier, en une ou deux étapes, en phase homogène ou hétérogène. De plus, les procédés de l'invention peuvent être couplés, dans un même essai, à la détection d'anticorps anti-HBc dans l'échantillon à analyser.

Les compositions diagnostiques correspondantes comprennent au moins un anticorps monoclonal de l'invention, ou un fragment ou dérivé de celui-ci, éventuellement en association avec au moins un réactif pour la détection d'anticorps anti-HBc et peuvent comprendre de plus au moins un autre anticorps monoclonal ou polyclonal pour la détection de l'antigène HBsAg qui reconnaît une région ou épitope différent de celui reconnu par les anticorps monoclonaux, fragments ou dérivés de l'invention. Les anticorps, fragments ou dérivés de l'invention peuvent être immobilisés sur une phase solide, comme anticorps de capture de l'antigène HBsAg ou utilisés en détection quand marqués avec tout marqueur approprié. Il est également envisagé d'utiliser les anticorps, fragments ou dérivés de l'invention comme phase de capture de l'antigène HBsAg et d'utiliser au moins un autre anticorps monoclonal ou polyclonal dirigé contre un épitope différent de celui reconnu par les anticorps de l'invention comme conjugué de détection, ou inversement. De même, les anticorps, fragments ou dérivés de l'invention et au moins un autre anticorps monoclonal ou polyclonal dirigé contre un épitope différent de celui reconnu par les anticorps de l'invention peuvent être immobilisés sur une même phase solide. Et de plus, un réactif capable de capturer les anticorps anti-HBc dans l'échantillon peut être immobilisé sur cette même phase

solide ou être inclus dans une composition de l'invention mais en étant immobilisé sur une phase solide différente de celle sur laquelle sont immobilisés les anticorps, fragments ou dérivés de l'invention et éventuellement au moins un autre anticorps monoclonal ou polyclonal anti-HBsAg reconnaissant un épitope différent de celui reconnu par les anticorps de l'invention.

L'invention concerne aussi un antisérum approprié pour une utilisation thérapeutique ou prophylactique pour une immunisation passive contre HBV qui comprend un anticorps monoclonal de l'invention ou un fragment ou dérivé d'un tel anticorps ou leurs combinaisons. L'antisérum peut de plus comprendre au moins anticorps monoclonal ou un anticorps polyclonal ou un mélange d'anticorps monoclonaux et polyclonaux anti-HBsAg, autres que l'anticorps monoclonal, fragment ou dérivé de l'invention.

Une composition appropriée pour une utilisation thérapeutique ou prophylactique pour une immunisation passive contre HBV comprend un anticorps monoclonal, ou un fragment ou dérivé de l'invention ou leurs combinaisons, en mélange avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Par « véhicule pharmaceutiquement acceptable » on entend les supports et véhicules administrables à l'être humain ou à un animal, tels que décrits par exemple dans Remington's Pharmaceutical Sciences 16th ed., Mack Publishing Co.

L'invention comprend donc de plus une méthode d'immunisation passive à but thérapeutique ou prophylactique contre HBV qui consiste à administrer à un individu une quantité thérapeutiquement ou prophylactiquement efficace d'un anticorps monoclonal, fragment ou dérivé de l'invention ou leurs combinaisons. Un ou plusieurs autres anticorps monoclonaux ou polyclonaux anti-HBsAg et dirigés contre un épitope différent de celui reconnu par les anticorps, fragments ou dérivés de l'invention peuvent également être administrés.

L'invention inclut également un anticorps anti-idiotype ou anti-idiotypique à un anticorps de l'invention tel que défini ci-dessus. L'anticorps anti-idiotype est un anticorps produit contre un autre anticorps et qui réagit avec le site spécifique de liaison antigénique de ce dernier ou idiotype. Les anticorps anti-idiotype fonctionnent comme l'antigène reconnu par l'idiotype. De tels anticorps sont particulièrement utiles dans le cas d'épitopes conformationnels. Les anticorps anti-idiotype qui représentent l'image interne de pathogènes externes, tels que les virus, sont utilisés comme « substituts » des antigènes pour la vaccination. L'importance

des anticorps anti-idiotypes *in vivo* a été démontrée dans de nombreuses expérimentations. L'administration d'anticorps anti-idiotype *in vivo* a pour effet soit une suppression ou une augmentation des réponses à l'idiotype spécifique. Les anticorps anti-idiotypes de l'invention sont capables d'induire chez l'animal une réponse par production d'anticorps anti-anti-idiotypes qui reconnaissent l'épitope 199-208 de l'antigène HBsAg et à ce titre ils sont capables d'immuniser un animal contre HBV, voire de neutraliser une infection par HBV. Aussi, la présente invention a pour objet une composition vaccinale qui comprend une quantité suffisante, pour immuniser un animal contre HBV, d'une composition active comprenant un anticorps monoclonal anti-idiotype qui induit chez l'animal la production d'un anticorps anti-anti-idiotype qui reconnaît la région 199-208 de l'antigène HBsAg ou un fragment Fab dudit anticorps anti-idiotype ou leur mélange et un adjuvant pharmaceutiquement acceptable, par exemple de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium. Les adjuvants pharmaceutiquement acceptables sont bien connus de l'homme du métier et on peut donner à titre de référence les adjuvants cités dans Remington's Pharmaceutical Sciences 16th ed., Mack Publishing Co. Si désiré, le vaccin peut contenir des quantités mineures de substances auxiliaires comme des agents mouillants ou émulsifiants, des agents qui tamponnent le pH. Le procédé pour immuniser un animal contre HBV consiste à lui administrer, en une ou plusieurs administrations, une composition vaccinale telle que définie ci-dessus. Bien entendu, après les essais *in vivo* sur les animaux, le but ultime d'une vaccination contre le virus HBV est de prévenir une infection chez l'homme. Aussi, le terme « animal » tel qu'utilisé ci-dessus fait référence à la fois aux animaux et à l'être humain. Le vaccin est préparé en mélangeant l'anticorps anti-idiotype de l'invention ou son fragment Fab dans un diluent approprié, qui peut être un tampon phosphate aqueux ou autre, de façon à obtenir une concentration finale de l'ordre de 1 mg par ml de protéine. Pour une administration à un homme de taille normale, par exemple, 50 µl (50 µg) à 100 µl (100 µg) de la solution sont dilués dans 4 500 µl et mélangés avec 500 µl d'un adjuvant pharmaceutiquement acceptable (pH 6,0 + 0,1). La dose variera en fonction de l'animal, de son âge et de son poids.

Les anticorps monoclonaux idiotype de l'invention sont produits par des techniques bien connues de l'homme du métier. L'épitope ou région 199-208 de l'antigène HBsAg est obtenu et purifié par toute technique actuellement disponible. L'anticorps idiotype (Ab1) est produit en immunisant un animal, de préférence murin, et en particulier une souris,

avec l'épitope précité, comme antigène. Les cellules de rate de l'animal sont ensuite identifiées, isolées et fusionnées avec des cellules de lymphome ou de myélome en présence d'un agent de fusion tel que le polyéthylène glycol (Köhler et Milstein, Nature 256 :459 (1975)). Les cellules fusionnées sont ensuite incubées dans un milieu sélectif qui inhibe la croissance des cellules malignes non fusionnées. Les cellules d'hybridome sont clonées par dilution limitante et testées pour la sécrétion d'un anticorps monoclonal de spécificité recherchée.. Les anticorps monoclonaux peuvent également être obtenus par croissance d'ascite *in vivo*. L'anticorps idiotype Ab1 est utilisé pour produire un anticorps anti-idiotype (Ab2) qui possède les propriétés d'immunisation, voire de neutralisation, contre HBV. Les anticorps anti-idiotype Ab2 sont obtenus par les mêmes procédés que ceux utilisés pour la production des anticorps Ab1, mais l'anticorps Ab1 est alors l'immunogène utilisé.

L'invention a également pour objet l'épitope conservé de l'antigène HBsAg mis en évidence par les inventeurs dont la séquence peptidique, représentée dans l'identificateur de séquences SEQ ID NO : 1, commence à l'acide aminé 199 et se termine à l'acide aminé 208 de l'antigène HBsAg et son utilisation comme peptide immunogène, ainsi que des peptides immunogènes caractérisés en ce que leur séquence peptidique comprend respectivement au moins trois et au moins quatre acides aminés homologues ou identiques aux acides aminés de l'épitope référencé en SEQ ID NO : 1, en particulier les peptides immunogènes illustrés en SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 3. Dans la comparaison des séquences SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO : 2 illustrée à la figure annexée, la séquence SEQ ID NO : 2 comporte trois acides aminés, W (tryptophane), P (proline), S (sérine) qui sont strictement homologues ou identiques aux acides aminés correspondants de SEQ ID NO :1 et un acide aminé I (isoleucine) qui est équivalent à L (leucine) de SEQ ID NO :1. Dans la comparaison des séquences SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO : 3 illustrée à la figure annexée, la séquence SEQ ID NO : 3 comporte quatre acides aminés qui sont strictement homologues ou identiques à ceux de SEQ ID NO : 1, il s'agit des acides aminés W (tryptophane), P (proline), Y (tyrosine), S (sérine), et deux acides aminés T (thréonine) et L (leucine) qui sont équivalents respectivement à S (sérine) et I (isoleucine) de SEQ ID NO :1. Les acides aminés dits équivalents sont des acides aminés qui peuvent se substituer les uns aux autres sans affecter le pouvoir immunogène des peptides. De tels peptides immunogènes sont utilisés pour la production d'anticorps monoclonaux, de fragments d'anticorps monoclonaux ou de dérivés d'anticorps monoclonaux répondant aux définitions données précédemment et

capables de reconnaître à la fois la forme sauvage et au moins une forme mutante de l'antigène HBsAg. La production d'anticorps monoclonaux, de fragments ou dérivés d'anticorps monoclonaux est bien connue de l'homme du métier. On peut citer à titre d'exemple Köhler et Milstein, Nature 256 : 45-47 (1975) et European Journal of Immunology 6 : 511-519 (1976) ainsi que Galfre G. et al. Nature, 266 : 522-550 (1977). L'épitope peut être produit par synthèse chimique ou par recombinaison génétique ou par une combinaison de différentes méthodes. La séquence codant pour l'épitope de l'invention peut ainsi être exprimée dans une cellule hôte appropriée sous le contrôle d'un promoteur approprié. Les cellules hôtes comprennent tout organisme unicellulaire capable de transcrire et de traduire des molécules d'ADN recombinant, telles que les cellules issues d'un organisme procaryote ou eucaryote incluant les cellules de mammifères, de levures et de bactéries, et permettant l'expression du fragment du gène S codant pour l'épitope de l'invention, le fragment du gène étant placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression. Par ailleurs, les peptides immunogènes SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 3 peuvent aisément être obtenus par synthèse chimique.

L'invention concerne enfin une sonde nucléique ou amorce capable de s'hybrider, dans des conditions de stringence déterminées, à une séquence nucléotidique ADN qui code pour l'épitope représenté en SEQ ID NO : 1 ou à la séquence nucléotidique ADN complémentaire de ladite séquence nucléotidique codant pour l'épitope représenté en SEQ ID NO : 1 ou au produit de transcription ARN desdites séquences nucléotidiques ADN.

L'invention concerne également une sonde nucléique ou amorce capable de s'hybrider, dans des conditions de stringence déterminées, à une séquence nucléotidique ADN représentée en SEQ ID NO : 4 qui code pour l'épitope représenté en SEQ ID NO : 1 ou à la séquence nucléotidique ADN complémentaire de SEQ ID NO : 4 ou au produit de transcription ARN desdites séquences nucléotidiques ADN ; une composition diagnostique comprenant au moins une sonde ou au moins une amorce telle que définie ci-dessus pour la détection et/ou la quantification de virus HBV (sauvage et/ou mutants) dans un échantillon biologique et un procédé de diagnostic d'ADN et/ou d'ARN de virus HBV (sauvage et/ou mutants) dans un échantillon biologique, selon lequel on prélève un échantillon biologique, tel que sérum, plasma ou échantillon tissulaire chez un patient suspecté d'être infecté par au moins un virus HBV, on traite si nécessaire ledit échantillon pour en extraire l'ADN et/ou l'ARN, on met en contact ledit échantillon avec au moins une sonde ou au moins une amorce,

dans des conditions de stringence déterminées et on détecte et/ou quantifie l'ADN et/ou ARN viral dans l'échantillon, soit par mise en évidence d'une hybridation dudit ADN et/ou ARN viral avec au moins une sonde, soit par amplification dudit ADN et/ou ARN. Dans le cas de l'utilisation de sondes nucléotidiques, la mise en évidence de la formation du complexe d'hybridation peut être effectuée directement par utilisation d'une sonde complémentaire ou sensiblement complémentaire de la séquence de la cible et marquée par tout marqueur approprié ou encore par mise en œuvre de la technique dite « sandwich » en une ou deux étapes qui consiste à utiliser une sonde de capture complémentaire ou sensiblement complémentaire d'une partie de la séquence de la cible et une sonde marquée par tout marqueur approprié ou sonde de détection complémentaire ou sensiblement complémentaire d'une autre partie de la séquence de la cible. Dans le cas d'utilisation d'amorces, celles-ci peuvent être directement marquées pour la mise en évidence d'un produit d'amplification marqué ou ne pas être marquées, auquel cas les produits d'amplification générés peuvent être sélectionnés en fonction de la taille attendue par passage sur gel d'acrylamide ou analysés à l'aide de sondes de détection appropriées.

A partir de la sélection de la séquence nucléotidique ADN qui code pour l'épitope 199-208 de l'invention, correspondant aux nucléotides 751-780 du génome de HBV décrit par Galibert et al. (Nature 280 : 646-650 (1979), représentée en SEQ ID NO : 4, de sa séquence complémentaire et de la séquence ARN correspondante, il est à la portée de l'homme du métier de déterminer et obtenir des sondes nucléotidiques ou des amorces capables de s'hybrider à SEQ ID NO : 4, à sa séquence complémentaire ou à la séquence ARN correspondante. On peut citer à titre d'exemples pour la production d'oligonucléotides l'utilisation d'enzymes de restriction et la synthèse chimique sur synthétiseur automatique. Les sondes et amorces susceptibles de s'hybrider dans des conditions de stringence déterminées à une séquence nucléotidique d'ADN ou d'ARN de l'invention font partie de cette définition. Il est à la portée de l'homme du métier de définir les conditions de stringence appropriées. Des conditions de stringence caractéristiques sont celles qui correspondent à une combinaison de la température et de la concentration saline choisie approximativement entre 12 à 20°C sous le T_m (« melting temperature ») de l'hybride à l'étude. Tout ceci fait partie des connaissances générales de l'homme du métier et on peut citer à titre d'illustration l'enseignement donné dans le livre intitulé « DNA PROBES » de George H. Keller et Mark M. Manak, Second Edition, édité en 1993 par Stockton Press, 49 West 24th St., New York,

N.Y. 10010, USA (voir plus précisément : Section I-Molecular Hybridization Technology, pp. 1-21).

Figure 1

5 La figure 1 annexée représente la séquence en acides aminés de l'antigène HBsAg. Sur cette figure est localisé l'épitope 199-208, mis en évidence par cartographie ou « mapping » d'épitopes comme illustré dans les exemples qui suivent. Les deux clones HWWKHPTRYSLG et HPLKQYWWRPSI qui présentent des acides aminés communs ou homologues ou identiques et des acides aminés équivalents aux acides aminés de la séquence
10 de l'antigène HBsAg de type sauvage dans la région comprise entre les acides aminés 194-209 de la séquence en acides aminés de l'antigène HBsAg sont représentés en dessous de la séquence de l'antigène HBs Ag de type sauvage. Les acides aminés communs ou homologues ou identiques et équivalents sont représentés en caractère gras dans la figure 1.

15 Exemples.

Exemple 1 : Production et caractérisation des anticorps monoclonaux.

Des souris femelles BALB/c JYco, âgées de 4 à 6 semaines (IFFA Credo), ont été immunisées par injection intrapéritonéale de 50 µg d'HBsAg $\alpha\gamma$ recombinant émulsifié
20 avec un volume égal de l'adjuvant complet de Freund. La protéine recombinante HBsAg $\alpha\gamma$ a été obtenue auprès de Pasteur Mérieux Connaught. Cette protéine correspond à la souche $\alpha\gamma\omega$ séquencée par Gallibert et al. (Nature 280 : 646-650 (1979)) et a été exprimée dans des cellules CHO (Michel et al., PNAS 81/ 7708-7712 (1984)). Elle est composée des régions pré-S et S. Les 55 acides aminés situés en position NH₂ terminale correspondent à la région pré-
25 S2.

Trois injections ont ensuite été effectuées toutes les deux semaines en présence d'adjuvant incomplet. Quatre jours après la dernière injection, les cellules de la rate ont été prélevées et fusionnées avec la lignée cellulaire de myélomes de souris Sp 2/O-Ag14, selon la technique décrite par Köhler & Milstein (Nature 256 : 45-47 (1975) ; European Journal of
30 Immunology 6 : 511-519 (1976)). Après avoir cultivé les cellules pendant 12 à 14 jours, les surnageants de culture ont été criblés par un test ELISA indirect avec l'antigène HBsAg plasmatique $\alpha\gamma$ recombinant fixé sur la phase solide. Mille cinquante huit surnageants de

culture, dilués au $1/10^{\text{ème}}$, ont ainsi été criblés. Soixante six clones positifs ont été sélectionnés pour lesquels la DO à 405 nm était d'environ 2, soit six fois supérieure à la valeur seuil, à cette même longueur d'onde, de 0,3. Les soixante six surnageants de culture des clones positifs, dilués au $1/10^{\text{ème}}$, ont ensuite été criblés par un test ELISA indirect avec de l'antigène HBsAg plasmatique $\alpha\gamma$ natif. Vingt clones ont été sélectionnés pour lesquels la DO à 405 nm était supérieure à 2, soit 24 fois supérieure à la valeur seuil, à cette même longueur d'onde, de 0,1. Les surnageants de culture de 12 sur ces 20 clones, dilués au $1/10^{\text{ème}}$, ont ensuite été testés par un test ELISA indirect, respectivement avec de l'antigène HBsAg $\alpha\gamma$ natif et de l'antigène HBsAg ad natif, fixé sur la phase solide. Six clones ont été sélectionnés dans chacun de ces tests, pour lesquels la DO à 405 nm était de 1,2 ou plus pour l'essai avec l'antigène HBsAg $\alpha\gamma$ natif et d'environ 1,1 pour l'essai avec l'antigène HBsAg ad natif, à une dilution au $1/1600^{\text{ème}}$ du surnageant de culture, soit une DO environ dix fois supérieure à la valeur seuil de 0,1. Quatre de ces six clones positifs ont été sous-clonés deux fois par dilution limitante et produits sous forme d'ascite. Les ascites ont été obtenus à partir de souris, ayant reçu au préalable une injection de Pristane (nom commercial), et auxquelles 10^6 cellules d'hybridomes ont été injectées.

Les quatre IgGs ainsi obtenues ont été purifiées sur une colonne de sépharose couplée à la protéine A 4FF, selon le protocole fourni par le fabricant (Pharmacia) et ont été utilisées pour la suite des expériences. En final, l'anticorps monoclonal 2G2G10, qui appartient à la classe des immunoglobulines IgG2b, a été retenu en raison de ses excellentes performances.

Exemple 2 : Changement de classe de l'anticorps 2G2G10.

La classe de l'anticorps monoclonal 2G2G10 a été changée d'IgG2b en IgG2a par traitement aux UV selon le protocole de Rosén et Klein (Nature 306 : 189-190 (1983)). L'anticorps modifié a été nommé 8B4H7.

Exemple 3 : Criblage d'une banque de peptides portés par des phages.

La banque Ph.D.-12TM commercialisée par New England Biolabs Inc. a été criblée par les anticorps monoclonaux 2G2G10 et 8B4H7 biotinylés selon la méthode décrite par Gretch et al. (Analytical Biochemistry 163 : 270-277 (1987)). C'est une banque combinatoire de dodecapeptides exprimés en N-terminal d'une protéine mineure d'enveloppe

(pUI) du phage M13. Elle contient environ 4.10^{12} phages/ml, représentant $1,9.10^9$ séquences différentes.

Lors du premier « biopanning », 10 µg de streptavidine en tampon NaHCO_3 0,1 M (pH 8,6) sont fixés dans une boîte de Pétri de 35 mm de diamètre, pendant une nuit, à 4°C, en chambre humide, sous agitation. La boîte est ensuite saturée pendant 2h à 4°C avec une solution de saturation [5mg/ml BSA; 0,02% NaN_3 dans NaHCO_3 0,1M (pH 8,6)]. Après 6 lavages en TBS (Tris Buffer Saline) [Tris 0,5 M; NaCl 0,75 M, pH 7,5]-Tween 0,1%, les anticorps monoclonaux biotinylés 2G2G10 ou 8B4H7 sont incubés à une concentration de 170 nM en TBS Tween 0,1% avec 0,02% NaN_3 et 1 mg/ml de BSA pendant 1 nuit à 4°C, en chambre humide et sous agitation. Pour bloquer les sites non occupés par l'anticorps, 40 µg de biotine sont ajoutés et incubés pendant 1 heure à 4°C, en chambre humide et sous agitation. Après 6 lavages en TBS Tween 0,1%, 10 µl de la banque (4.10^9 phages) dilués dans du TBS Tween 0,1 %-biotine 0,1nM sont incubés 1 heure à température ambiante, sous agitation. Les phages non fixés sont ensuite éliminés par 10 lavages en TBS Tween 0,1%. L'élution des phages fixés se fait par une incubation de 7 minutes avec le tampon d'élution [0,1M HCl-Glycine; pH 2,2; 1 mg/ml BSA; 0.1 mg/ml rouge de phénol]. L'éluat est neutralisé par 200 µl de Tris-HCl 1M pH 9,1.

Les éluats correspondant aux criblages de la banque, soit avec 2G2G10, soit avec 8B4H7 sont amplifiés séparément par infection de la souche ER2537 d'*Escherichia coli* en milieu LB [tryptone 10 g/l ; extrait de levure 5 g/l; NaCl 10 g/l; pH 7,5]. Après 4h30 d'incubation à 37°C à 250 tpm, les débris cellulaires sont éliminés par deux centrifugations successives de 10 min. à 10 000 tpm. Les phages contenus dans les surnageants sont précipités deux fois avec 1/6^{ème} de Polyéthylène glycol/NaCl [Polyéthylène glycol 16,7 %, NaCl 3,3 M]. Après une centrifugation de 15 min. à 14 000 tpm, les culots sont repris par 200 µl de TBS- NaN_3 0,02%. 100 µl de ces éluats amplifiés sont utilisés pour les deuxièmes biopannings.

Pour les 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} « biopannings », 100 µl des éluats amplifiés précédents sont préincubés avec respectivement 100 nM, 1 nM et 0,1 nM des anticorps biotinylés 2G2G10 ou 8B4H7 pendant une nuit à 4°C, pendant que 10 µg de streptavidine sont fixés sur une boîte de Pétri, comme précédemment. Les mélanges phages/anticorps sont ajoutés après saturation des boîtes, pendant 15 minutes à température ambiante. La suite du protocole est semblable à celui des premiers « biopannings ».

Exemple 4 : Clonage et amplification des clones de phages.

Une culture d'*E. coli* est incubée à 37°C à 250 tpm jusqu'à ce que la densité optique (DO) atteigne 0.5. Pendant la croissance bactérienne, de l'agarose top [1 l LB ; 10 g bacto-tryptone ; 5 g extrait de levure ; 5 g NaCl ; 1 g MgCl₂, 6H₂O ; 7g agarose] est fondu et
5 aliquoté par 3 ml, et conservé à 55°C. Lorsque les cellules sont prêtes, 200 µl de culture sont incubées de 1 à 5 minutes à température ambiante avec 10 µl des éluat obtenus après les 4^{ème} biopannings et dilués en milieu LB. Le mélange est ensuite transféré dans 2 tubes d'agarose, vortexés et rapidement étalés sur des boîtes LB IPTG/XGal. Les boîtes sont
10 incubées une nuit à 37°C.

36 colonies choisies au hasard sur les boîtes correspondants au criblage par 2G2G10 ou 8B4H7 sont amplifiées par infection d'1 ml d'une culture d'*E. coli* pendant 4 à 5 heures à 37°C, puis les cellules sont éliminées par centrifugation 30 s à 14 000 tpm. 500 µl du surnageant sont utilisés pour le séquençage, le reste est centrifugé de nouveau, dilué 1:1 dans
15 du glycérol et conservé à -20°C.

2 µl de phages conservés en LB/Glycérol sont amplifiés par infection de 1,7 ml d'une culture de *E. coli* pendant 24 heures à 37°C et 250 tpm. Les cellules sont éliminées par centrifugation 5 min. à 14 000 tpm. Le surnageant est précipité par du PEG/NaCl. Après une centrifugation de 15 min. à 14 000 tpm, le culot est repris par 500 µl de TBS. Ces solutions de
20 phages sont dosées par spectrométrie d'absorption à 269 nm et utilisées pour les tests en ELISA.

Exemple 5 : Séquençage des séquences insérées dans les clones phagiques.

L'extraction et la purification de l'ADN des différents clones sont effectuées à
25 partir de 500 µl de surnageant qui sont précipités par 200 µl de PEG/NaCl pendant 10 min. à température ambiante. Après centrifugation 10 min. à 14 000 tpm, le culot est repris par 100 µl de Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, NaI 4M et 250 µl d'éthanol absolu puis incubé 10 min. à température ambiante. Après centrifugation 10 min. à 14 000 tpm, le culot est lavé une fois par 500 µl d'éthanol 70%, puis séché 10 min. sous vide. Il est finalement repris par 30
30 µl de Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM.

Le séquençage nucléotidique de l'insert est effectué selon la méthode modifiée de Sanger avec un séquenceur automatique (modèle 377A, Perkin Elmer) en utilisant le kit de

séquençage "Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction" (Perkin-Elmer) et l'amorce 5'HO-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-OH3' correspondant à la séquence sauvage du phage. Le mélange réactionnel est composé de 5 µl d'ADN à séquencer, 2,5 pmoles d'oligonucléotides dans 2,5µl d'eau, 8 µl de mélange "Big Dye™" contenant les
5 didésoxyribonucléotides et la Taq™ polymérase, et 4.5 µl de H₂O. Les 25 cycles de séquençage (30 s à 96°C, 15 s à 50°C, 4 min. à 60 °C) sont effectués dans un appareil PCR (Polymerase Chain Reaction) Trioblock de Biométra. Les fractions de séquence sont purifiées sur colonne Sephadex G50 équilibrée avec du tampon TE [tris-Hcl 10mM pH8, EDTA 1mM], séchées et conservées à -20°C jusqu'au séquençage. Les séquences protéiques sont déduites
10 des séquences nucléotidiques avec le logiciel Geneworks,

Exemple 6 : Analyse immunologique des clones de phages.

100µl des anticorps anti-HBsAg 2G2G10 ou 8B4H7 ou d'un anticorps non pertinent utilisé comme contrôle négatif à la concentration finale de 100 µg/ml en tampon
15 NaHCO₃ 0,1 M sont fixés pendant une nuit à 4°C, en chambre humide, sur des rangées de puits de plaques ELISA "Nunc Maxisorb". La plaque est ensuite saturée 2 heures à 4°C en solution de saturation [NaHCO₃ 0,1 M ; BSA 50 mg/ml ; NaN₃ 0,02 %]. Après 4 lavages en TBS-Tween 0.5 %, 100 µl de différentes concentrations de phages dilués en TBS Tween (1.10¹², 2,5.10¹¹, 6,2.10¹⁰ et 4.10⁹ phages/ml) sont ajoutés par puits et incubés 2 heures à
20 température ambiante, sous agitation. Après 4 lavages en TBS Tween 0.5 %, 100 µl/puits d'anticorps anti-M13 couplé à la peroxydase et dilué au 1/5000 en solution de saturation sont incubés pendant 2 heures à température ambiante, sous agitation. Après incubation de 1 heure à 37°C, la plaque est lavée 4 fois en TBS-Tween 0,5 %. Pour la révélation, la plaque est incubée avec une solution d'o-phénylènediamine et de peroxyde d'hydrogène (kit colorEIA,
25 bioMérieux) pendant 10 min. à l'obscurité. La réaction est stoppée par de l'acide sulfurique 1,8 N et la plaque est lue à 492 nm, avec un lecteur de plaques ELISA (Axia microreader). Pour chaque dilution de chaque clone les résultats sont exprimés par la différence des valeurs obtenues entre l'anticorps anti-HBsAg et l'anticorps contrôle. Les résultats sont ensuite confirmés en testant les dilutions optimales en triplicate.

30 Aucun clone immunoréactif n'a pu être sélectionné par l'anticorps 2G2G10. Par contre, l'anticorps équivalent 8B4H7 ayant le même paratope mais de classe IgG 2a a permis

de sélectionner des clones immunoréactifs (tableau 1). De plus deux de ces clones (HWWKHPTRYSLG et HPLKQYWWRPSI) sont aussi reconnus par l'anticorps 2G2G10.

Tableau 1

Fréquence et immunoréactivité des clones phagiques sélectionnés avec l'anticorps 2G2G10 et l'anticorps modifié 8B4H7.

Séquence des clones	Fréquence des clones	Réactivité avec 8B4H7 ^a		Réactivité avec 2G2G10 ^b
HKMHSHPRLTSP	13/36	< 0,1 ^c		
HWGNHSHSPQR	6/36	< 0,1		
WHKAVPRWLASP	4/36	0,8	0,4 ^d	< 0,1 ^c
HMAHRWQSFLRP	2/36	< 0,1		
RVHKRHRRTQKNA	1/36	> 2,5	< 0,1	
HWWKHPTRYSLG	1/36	> 2,5	0,5	> 2,5
HFFKLSNWRTTP	1/36	22,5	< 0,1	
HPLKQYWWRPSI	1/36	< 0,1		0,4

L'immunoréactivité des clones a été déterminée par ELISA comme indiqué dans l'exemple 6, avec 8B4H7^a ou 2G2G10^b fixé sur la phase solide et les clones de phage sont ajoutés à la dilution finale de 8×10^{10} phages /ml^c et 2×10^{10} phages /ml^d.

Exemple 7: Localisation des séquences des clones phagiques immunoréactifs sur la séquence de l'HBsAg.

Les séquences en acides aminés des peptides ont été comparées à la séquence de la protéine recombinante d'HBsAg ayant servi à l'obtention de l'anticorps monoclonal (Galibert et al, 1979) en utilisant le logiciel Mac Vector, Ver.4.5 (Kodack). Brièvement, les régions de haute similarité sont détectées avec le programme LFASTA qui recherche les meilleures identités locales (Pearson et Lipman, PNAS 85 : 2444-2448 (1988)). Les deux clones immunoréactifs vis à vis de 2G2G10 ont permis de localiser clairement l'épitope reconnu par 2G2G10 et 8B4H7 dans la région 199-208 de HBsAg (Figure 1). En effet, HWWKHPTRYSLG a 4 résidus identiques et 3 résidus similaires avec la séquence 199-208 tandis que HPLKQYWWRPSI partage 3 résidus identiques et 1 résidu similaire avec la séquence 201-205.

Exemple 8 :Détection de l'antigène HBsAg de type sauvage et de variants HBsAg à l'aide des anticorps monoclonaux 2G2G10 et 8B4H7.

Le format utilisé est un format de type sandwich utilisant l'anticorps monoclonal 2G2G10 ou 8B4H7 en capture et un anticorps polyclonal de chèvre anti-HBs en détection.

- 5 - Détection de l'antigène HBsAg sauvage dans des sérums de patients :

Des sérums de patients fournis par la Société Nationale de Transfusion Sanguine de Lille comprenant plusieurs sous types (échantillons dilués) ont été testés avec l'anticorps monoclonal 2G2G10 en capture et un anticorps polyclonal de chèvre anti-HBs en détection. Les résultats sont présentés dans le tableau 2 ci-dessous. Les échantillons testés sont identifiés
10 selon leur sous type et leur origine. Les résultats sont exprimés en signal détecté par rapport à une valeur seuil. La valeur seuil correspond à cinq fois le signal de l'échantillon négatif. Les valeurs dont le signal/valeur seuil est supérieur à 1 sont positives.

Tableau 2

Identification de l'échantillon / sous types	Signal / Valeur seuil
41 - adw2 - (US+Asie)	2,91
42 - adw4 - (Eur.+Am.sud)	3,04
43 - adr - (Asie)	2,94
44 - ayw1	3,00
45 - ayw2 - (Europe sud)	3,94
46 - ayw3 - (Europe-Asie)	3,42
47 - ayw3	3,07
48 - ayw4 - (Afrique)	4,02
49 - ayr - (Japon)	4,00
50 - Négatif / Diluant des échantillons	0,2

15

- Détection de l'antigène HBsAg sauvage dans des plasmas :

Des plasmas de la sérothèque de bioMérieux ont été testés dans les mêmes conditions que ci-dessus en utilisant à la fois l'anticorps monoclonal 2G2G10 et l'anticorps monoclonal 8B4H7 en capture. Les résultats sont présentés dans le tableau 3 ci-dessous. Ils
20 sont exprimés en signal/valeur seuil. La valeur seuil correspond à cinq fois le signal de l'échantillon négatif. Les valeurs dont le signal/valeur seuil est supérieur à 1 sont positives.

Tableau 3

Echantillon	2G2G10 // signal/valeur seuil	8B4H7 // signal/valeur seuil
MAP 52 1/600	25,7	29,4
MAP 97 1/50000	24,6	36,1
MAP 59 1/3000	42,2	43,0
MAP 62 1/7000	46,0	47,6
MAP 64 1/6000	54,7	70,7
H80 1/7000	58,9	56,9
I44519 1/6000	52,2	54,0
I44344 1/16000	62,7	69,3

- Détection des variants HBsAg :

L'anticorps 2G2G10 a été testé pour sa capacité à détecter des mutants HBsAg à partir de surnageants de culture des variants HBsAg recombinants qui ont été obtenus auprès du Dr Carman et préparés selon la méthode décrite précédemment par Ireland et al., (Hepatology 31 : 1176-1181(2000)).

Les dosages ont été effectués en utilisant un test qualitatif fluoro-immunoenzymatique développé sur l'analyseur automatique Vidas (marque enregistrée) (Weber et al., Journal of Virological Methods 42 : 63-74 (1993); Mikkelsen et al., Gynecologic Obstetric Investigation 41 : 35-40 (1996)). Ce test de capture en deux étapes a été effectué comme suit :

L'anticorps 2G2G10 été fixé sur le réceptacle phase solide (SPR pour Receptacle Solid Phase) à la concentration finale de 10 µg/ml. Le SPR a ensuite été mis à incuber simultanément avec les surnageants de culture contenant les protéines recombinantes correspondant aux différents variants et l'anticorps polyclonal de chèvre biotinylé anti-HBsAg. La seconde étape a ensuite utilisé le conjugué streptavidine-phosphatase alcaline pour la réaction fluorométrique.

Ainsi que le montre le tableau 4, en comparaison d'un autre anticorps anti-HBsAg 6H6B6, l'anticorps 2G2G10 est capable de détecter les différents variants testés. En effet, les échantillons BA3.2 et T5N portent respectivement les mutations C124R et T23N qui affectent ainsi que l'ont rapporté Ireland et al., (Hepatology 31 : 1176-1181 (2000)) la sécrétion de l'antigène dans les surnageants de cultures testés. L'absence de détection de ces deux surnageants ne peut donc être prise en compte.

Tableau 4
Réactivité des anticorps anti-HBsAg vis à vis de variants HBsAg.

Mutations dans le MHR	Echantillon	2G2G10	6H6B6
Séquence standard	Gly D	3.3	3.0
Séquence standard	Gly Y	4.9	4,3
plasmide contrôle ^a		0.2	0.3
P120T	BA 2.4	3.3	3.5
C121R	J1 ^a	6.7	27.5
T123N	BA 3.4	2.2	0.3
T123N/C124R	BA 3.2 ^a	0.2	0.3
M133T	SA7	3.0	2.1
F134L	J2	2.3	3.0
D144A	AP 3.1	4.7	0.7
G145R	Arg 1.2	7.2	0.4
Q129R/G130N/A166V	SA6	4.6	2.6
Q30R/S53L/L98V/Q101R/S210T	HK188	27.4	24.2
S143L	1043 Sp	3.0	0.7
P127A/S143L	1157 Sp	3.4	0.3
P120S/S143L	1056 Sp	1.8	0.5
Y100S/T118V/R122K/M133I/Y134N/P142S/S143L/G145K	M5	2.0	0.7
polysubstitution including D144E	PA17	2.5	2.3
D99N/I22NT123/G145R	T5N ^a	0.2	0.3

MHR : signifie région hydrophile majeure.

5 Les résultats sont exprimés par le signal moyen de duplicate /une valeur seuil.
Pour chaque anticorps, la valeur seuil a été définie par le signal moyen de duplicates obtenus avec 0.16 ng/ml d'HBsAg plasmatique purifié des sous-types, *ad lay*.

^a Echantillons non dilués.

REVENDICATIONS

1. Anticorps monoclonal capable de se lier à un antigène HBsAg de type sauvage
5 et à au moins une, de préférence au moins deux et avantageusement plus de deux, formes
mutantes de l'antigène HBsAg, ledit anticorps monoclonal se liant à une séquence peptidique
consistant en au moins 6 acides aminés contigus dans la région 199-208 de l'antigène HBsAg,
et avantageusement se liant à la séquence peptidique constituée par la région 199-208 de
l'antigène HBsAg.
- 10 2. Anticorps monoclonal selon la revendication 1, capable de se lier à au moins
une forme mutante de l'antigène HBsAg qui comprend au moins une substitution d'un acide
aminé dans le déterminant « a » de l'antigène HBsAg.
3. Anticorps monoclonal selon la revendication 2, capable de se lier à au moins
une forme mutante de l'antigène HBsAg qui comprend au moins une substitution d'un acide
15 aminé dans le déterminant « a » de l'antigène HBsAg aux positions 127, 133, 134, 142, 143,
144 ou 145 de l'antigène HBsAg et éventuellement au moins une autre substitution d'un acide
aminé à la position 100, 118, 120, 122 de l'antigène HBsAg.
4. Anticorps monoclonal selon la revendication 3, capable de se lier à la forme
mutante de l'antigène HBsAg qui comprend au moins une substitution correspondant en un
20 remplacement d'une sérine par une leucine à la position 143 de l'antigène HBsAg.
5. Anticorps monoclonal selon la revendication 3, capable de se lier à la forme
mutante de l'antigène HBsAg qui comprend au moins une substitution correspondant en un
remplacement d'un acide aspartique par une alanine à la position 144 de l'antigène HBsAg.
6. Anticorps monoclonal selon la revendication 3, capable de se lier à la forme
25 mutante de l'antigène HBsAg qui comprend au moins une substitution correspondant en un
remplacement d'une glycine par une arginine à la position 145 de l'antigène HBsAg.
7. Anticorps monoclonal selon la revendication 3, capable de se lier à la forme
mutante de l'antigène HBsAg qui comprend au moins une substitution correspondant en un
remplacement d'une proline par une alanine à la position 127 de l'antigène HBsAg et au
30 moins une substitution correspondant en un remplacement d'une sérine par une leucine à la
position 143 de l'antigène HBsAg.

22. Procédé selon l'une quelconque des revendications 19 à 21, dans lequel la détection de l'antigène HBsAg est effectué simultanément avec la détection d'anticorps anti-HBc.

23. Composition diagnostique qui comprend au moins un anticorps monoclonal
5 tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 12 ou dans la revendication 18, ou un fragment ou dérivé tel que défini dans la revendication 14 et la revendication 13, éventuellement en association avec au moins un réactif pour la détection d'anticorps anti-HBc.

24. Composition diagnostique selon la revendication 23, qui comprend de plus
10 au moins un autre anticorps monoclonal ou polyclonal pour la détection de l'antigène HBsAg.

25. Antisérum qui comprend un anticorps monoclonal tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 12 ou dans la revendication 18, ou un fragment ou dérivé tel que défini dans la revendication 14 et la revendication 13 ou leurs combinaisons.

26. Antisérum selon la revendication 25, qui comprend également au moins
15 anticorps monoclonal ou un anticorps polyclonal ou un mélange d'anticorps monoclonaux et polyclonaux anti-HBsAg, autres que l'anticorps monoclonal défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 12 ou dans la revendication 18 ou d'un fragment ou dérivé tel que défini dans la revendication 14 et la revendication 13.

27. Composition appropriée pour une utilisation thérapeutique ou prophylactique
20 pour une immunisation passive contre HBV qui comprend un anticorps monoclonal tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 12 ou dans la revendication 18, ou un fragment ou dérivé tel que défini dans la revendication 14 et la revendication 13 ou leurs combinaisons, en mélange avec un support pharmaceutiquement acceptable.

28. Composition appropriée pour une utilisation thérapeutique ou prophylactique
25 pour une immunisation passive contre HBV qui comprend également au moins anticorps monoclonal ou un anticorps polyclonal ou un mélange d'anticorps monoclonaux et polyclonaux anti-HBsAg, autres que l'anticorps monoclonal défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 12 ou dans la revendication 18 ou d'un fragment ou dérivé tel que défini dans la revendication 14 et la revendication 13.

29. Anticorps anti-idiotype à un anticorps monoclonal tel que défini dans l'une
30 quelconque des revendications 1 à 12 ou dans la revendication 18 ou d'un fragment ou dérivé tel que défini dans la revendication 14 et la revendication 13.

30. Composition vaccinale qui comprend une quantité suffisante, pour immuniser un animal contre HBV, d'une composition active biologiquement comprenant un anticorps monoclonal anti-idiotype selon la revendication 29 qui induit chez l'animal la production d'un anticorps anti-anti-idiotype qui reconnaît la région 199-208 de l'antigène HBsAg ou un fragment Fab dudit anticorps anti-idiotype ou leur mélange et un adjuvant pharmaceutiquement acceptable.

31. Epitope de l'antigène HBsAg dont la séquence peptidique commence à l'acide aminé 199 et se termine à l'acide aminé 208 de l'antigène HBsAg et est représentée en SEQ ID NO : 1.

32. Peptide immunogène qui comprend l'épitope ou qui consiste en l'épitope de la revendication 31.

33. Peptide immunogène dont la séquence peptidique comprend au moins trois acides aminés homologues ou identiques aux acides aminés de la séquence peptidique de l'épitope de la revendication 31.

34. Peptide immunogène selon la revendication 33 dont la séquence peptidique consiste en la séquence SEQ ID NO : 2.

35. Peptide immunogène dont la séquence peptidique comprend au moins quatre acides aminés homologues ou identiques aux acides aminés de la séquence peptidique de l'épitope de la revendication 31.

36. Peptide immunogène selon la revendication 35 dont la séquence peptidique consiste en la séquence SEQ ID NO : 3.

37. Procédé d'obtention d'anticorps monoclonaux selon la revendication 17, de fragments d'anticorps monoclonaux, ou de dérivés d'anticorps monoclonaux en utilisant un peptide immunogène selon l'une quelconque des revendications 32 à 36.

38. Sonde nucléique ou amorce capable de s'hybrider, dans des conditions de stringence déterminées, à une séquence nucléotidique ADN qui code pour l'épitope de la revendication 31 ou à la séquence nucléotidique ADN complémentaire de ladite séquence nucléotidique codant pour l'épitope de la revendication 31 ou au produit de transcription ARN desdites séquences nucléotidiques ADN.

39. Sonde nucléique ou amorce selon la revendication 38 capable de s'hybrider, dans des conditions de stringence déterminées, à une séquence nucléotidique ADN représentée en SEQ ID NO : 4 qui code pour l'épitope de la revendication 31 ou à la séquence

nucléotidique ADN complémentaire de SEQ ID NO : 4 ou au produit de transcription ARN desdites séquences nucléotidiques ADN.

5 40. Composition diagnostique comprenant au moins une sonde ou au moins une amorce selon l'une des revendications 38 ou 39 pour la détection et/ou la quantification de virus HBV dans un échantillon biologique.

41. Procédé de diagnostic *in vitro* d'ADN et/ou d'ARN de virus HBV dans un échantillon biologique, selon lequel on prélève un échantillon biologique, tel que sérum, plasma ou échantillon tissulaire chez un patient suspecté d'être infecté par au moins un virus HBV, on traite si nécessaire ledit échantillon pour en extraire l'ADN et/ou l'ARN, on met en
10 contact ledit échantillon avec au moins une sonde ou au moins une amorce selon la revendication 38, dans des conditions de stringence déterminées et on détecte et/ou quantifie l'ADN et/ou ARN viral dans l'échantillon, soit par mise en évidence d'une hybridation dudit ADN et/ou ARN viral avec au moins une sonde, soit par amplification dudit ADN et/ou ARN.

15

1/1

10 20 30
M E N I T S G F L G P L L V L Q A G F F L L T R I L T I P Q

40 50 60
S L D S W W T S L N P L G G T T V C L G Q N S Q S P T S N H

70 80 90
S P T S C P P T C P G Y R W M C L R R F I I F L F I L L L C

100 110 120
L I F L L V L L D Y Q G M L P V C P L I P G S S T T S T G P

130 140 150
C R T C M T T A Q G T S M Y P S C C C T K P S D G N C T C I

160 170 180
P I P S S W A F G K F L W E W A S A R F S W L S L L V P F V

190 200 210
Q W F V G L S P T V W L S V I W M M WY WG PS LY SI LS
H P L K Q Y W W R P S I
H W W K H P T R Y S L G

220
P F L P L L P I F F C L W V Y I

FIGURE 1

LISTE DE SEQUENCES

5 <110> BIOMERIEUX
 <120> ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGES CONTRE DES VIRUS DE
 L'HEPATITE B
 <130> IFB BIOM TOPE
 10 <140>
 <141>
 <160> 4
 15 <170> Patentin Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: fragment
 25 de la protéine HBSAg du virus de l'hépatite B
 <400> 1
 Tyr Tyr Trp Gly Prc Ser Leu Tyr Ser Ile
 1 5 10
 30
 <210> 2
 <211> 12
 <212> PRT
 35 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: fragment
 de la protéine HBSAg du virus de l'hépatite B
 40
 <400> 2
 His Pro Leu Lys Gln Tyr Trp Trp Arg Pro Ser Ile
 1 5 10
 45
 <210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle
 50
 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: fragment
 de la protéine HBSAg du virus de l'hépatite B
 55
 <400> 3
 His Trp Trp Lys His Pro Thr Arg Tyr Ser Leu Gly
 1 5 10
 60
 <210> 4
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

· 220·

· 223· Description de la séquence artificielle: fragment
de la séquence nucléotidique codant pour la
protéine HBSAg du virus de l'hépatite B

5

<400> 4

tggtattggg ggccaagtct gtacagcatc

30

10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 01/03169

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K16/08 A61K39/42 C12N5/20 G01N33/53 C12Q1/70
A61P31/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6 030 616 A (WATERS ET AL.) 29 February 2000 (2000-02-29) column 7; example 4 column 3, line 43 - line 57	1
Y	WO 95 16704 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS) 22 June 1995 (1995-06-22) page 16, line 1	1
A	PAULIJ W P ET AL: "Localization of a unique hepatitis B virus epitope sheds new light on the structure of hepatitis B virus surface antigen." JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 80, no. 8, August 1999 (1999-08), pages 2121-2126, XP002174119 ISSN: 0022-1317 the whole document	1-41



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

8 document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 April 2002

Date of mailing of the international search report

17/04/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Flao, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/03169

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	COOREMAN MICHEL P ET AL: "Characterization of the reactivity pattern of murine monoclonal antibodies against wild-type hepatitis B surface antigen to G145R and other naturally occurring "a" loop escape mutations." HEPATOLOGY, vol. 30, no. 6, November 1999 (1999-11), pages 1287-1292, XP001015475 ISSN: 0270-9139 the whole document	1-41
P,X	--- JOLIVET-REYNAUD C ET AL: "Localization of hepatitis B surface antigen epitopes present on variants and specifically recognised by anti-hepatitis B surface antigen monoclonal antibodies." JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY, (2001 OCT) 65 (2) 241-9. , XP002195005 the whole document	1-41
P,A	--- IJAZ SAMREEN ET AL: "Novel immunoassay for the detection of hepatitis B surface 'Escape' mutants and its application in liver transplant recipients." JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY, vol. 63, no. 3, March 2001 (2001-03), pages 210-216, XP001015468 ISSN: 0146-6615 the whole document	1-41

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/03169

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6030616	A	29-02-2000	AU 681636 B2	04-09-1997
			AU 6287094 A	11-10-1994
			CA 2158866 A1	29-09-1994
			CN 1121357 A	24-04-1996
			EP 0689605 A1	03-01-1996
			WO 9421812 A2	29-09-1994
			JP 8510635 T	12-11-1996
			NO 953749 A	22-11-1995
			NZ 262929 A	22-08-1997
			PL 310699 A1	27-12-1995
WO 9516704	A	22-06-1995	WO 9516704 A1	22-06-1995

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Je Internationale No

PCT/FR 01/03169

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07K16/08 A61K39/42 C12N5/20 G01N33/53 C12Q1/70
A61P31/20

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K A61K A61P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	US 6 030 616 A (WATERS ET AL.) 29 février 2000 (2000-02-29) colonne 7; exemple 4 colonne 3, ligne 43 - ligne 57 ---	1
Y	WO 95 16704 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS) 22 juin 1995 (1995-06-22) page 16, ligne 1 ---	1
A	PAULIJ W P ET AL: "Localization of a unique hepatitis B virus epitope sheds new light on the structure of hepatitis B virus surface antigen." JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 80, no. 8, août 1999 (1999-08), pages 2121-2126, XP002174119 ISSN: 0022-1317 le document en entier ---	1-41
	-/--	



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

G document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

3 avril 2002

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

17/04/2002

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Le Flao, K

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

C de Internationale No
PCT/FR 01/03169

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	COOREMAN MICHEL P ET AL: "Characterization of the reactivity pattern of murine monoclonal antibodies against wild-type hepatitis B surface antigen to G145R and other naturally occurring "a" loop escape mutations." HEPATOLOGY, vol. 30, no. 6, novembre 1999 (1999-11), pages 1287-1292, XP001015475 ISSN: 0270-9139 le document en entier	1-41
P,X	JOLIVET-REYNAUD C ET AL: "Localization of hepatitis B surface antigen epitopes present on variants and specifically recognised by anti-hepatitis B surface antigen monoclonal antibodies." JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY, (2001 OCT) 65 (2) 241-9. , XP002195005 le document en entier	1-41
P,A	IJAZ SAMREEN ET AL: "Novel immunoassay for the detection of hepatitis B surface 'Escape' mutants and its application in liver transplant recipients." JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY, vol. 63, no. 3, mars 2001 (2001-03), pages 210-216, XP001015468 ISSN: 0146-6615 le document en entier	1-41

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

I de Internationale No

PCT/FR 01/03169

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 6030616	A	29-02-2000	AU 681636 B2	04-09-1997
			AU 6287094 A	11-10-1994
			CA 2158866 A1	29-09-1994
			CN 1121357 A	24-04-1996
			EP 0689605 A1	03-01-1996
			WO 9421812 A2	29-09-1994
			JP 8510635 T	12-11-1996
			NO 953749 A	22-11-1995
			NZ 262929 A	22-08-1997
			PL 310699 A1	27-12-1995
WO 9516704	A	22-06-1995	WO 9516704 A1	22-06-1995

THIS PAGE BLANK (USPTO)